

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-211461

(P2019-211461A)

(43) 公開日 令和1年12月12日(2019.12.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	A
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	P
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 33/483	C
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y

審査請求 有 請求項の数 11 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2018-208076 (P2018-208076)	(71) 出願人	503416331
(22) 出願日	平成30年11月5日 (2018.11.5)		國立臺灣科技大學
(31) 優先権主張番号	107118500		台灣台北市基隆路四段43號
(32) 優先日	平成30年5月30日 (2018.5.30)	(74) 代理人	100082418
(33) 優先権主張国・地域又は機関	台灣 (TW)		弁理士 山口 朔生
		(74) 代理人	100167601
			弁理士 大島 信之
		(74) 代理人	100201329
			弁理士 山口 真二郎
		(72) 発明者	王靖維
			台灣台北市基隆路四段43號
		(72) 発明者	陳燕麟
			台灣台北市基隆路四段43號
		Fターム(参考)	2G045 AA26 CB01 DA36 FA19

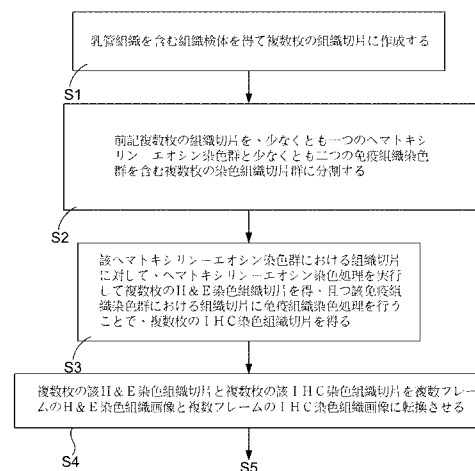
(54) 【発明の名称】 癌の診断支援に使用されるクロス染色とマルチバイオマーカー方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】癌タイプの識別と診断支援に使用可能な、クロス染色とマルチバイオマーカー方法を提供する。

【解決手段】組織切片の画像を先にH & E染色組織画像とIHC染色組織画像の二組に分け、次に、別々のIHC染色組織画像とH & E染色組織画像に対して、クロス染色画像登録・融合処理を行うことによって、複数フレームのクロス染色組織画像を得、更に、特別に設計されたバイオマーカーの性能認識プロセスを通じて、得た前記複数フレームのクロス染色組織画像に腫瘍認識と定量分析を実行して、最後に、該組織検体が罹患した癌の細胞種類とその比率を自動的認識可能になる、という技術特徴を有しているクロス染色とマルチバイオマーカー方法。

【選択図】図2A



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

クロス染色とマルチバイオマーカー方法であって、癌タイプの識別と診断支援に使用可能で、

(1) ある乳管組織を含む組織検体を取得してから、複数枚の組織切片を作成することと、

(2) 前記複数枚の組織切片を、少なくとも一つのヘマトキシリン - エオシン染色 (H & E s t a i n) 群と、少なくとも複数の免疫組織染色 (I m m u n o h i s t o c h e m i s t r y s t a i n , I H C s t a i n) 群とを含む複数の染色組織切片群に分割することであって、そのうち、該複数の I H C 染色群は少なくとも、E - カドヘリンの I H C 染色群、癌タンパク質 p 6 3 の I H C 染色群、サイトケラチン C K 1 4 の I H C 染色群、及びサイトケラチン C K 5 / 6 の I H C 染色群を含むことと、

(3) 該ヘマトキシリン - エオシン染色群における組織切片に対して、ヘマトキシリン - エオシン染色処理を実行して複数枚の H & E 染色組織切片を得、且つ該複数の免疫組織染色群における組織切片に免疫組織染色処理を行うことで、複数枚の I H C 染色組織切片を得ることと、

(4) 複数枚の該 H & E 染色組織切片と複数枚の該 I H C 染色組織切片を複数フレームの H & E 染色組織画像と複数フレームの I H C 染色組織画像に転換させることと、

(5) これらの H & E 染色組織画像と I H C 染色組織画像にクロス染色画像登録・融合を行うことと、

(6) あらゆる I H C 染色組織画像と H & E 染色組織画像は全部、前記クロス染色画像登録・融合を完成して、複数フレームのクロス染色組織画像を得るまで、該ステップ (5) を繰り返すこと、及び、

(7) 得る該複数フレームのクロス染色組織画像に対して、腫瘍認識と定量分析を行うことで、該組織検体が罹患した癌細胞のタイプとその比率を自動的に識別することと、の各ステップを含むことを特徴とする、

クロス染色とマルチバイオマーカー方法。

【請求項 2】

対応する少なくとも一種類のたんぱく質を含有する組織切片を選択するように、前記免疫組織染色処理をする前に、少なくとも一種類のたんぱく質地図を参照することを特徴とする請求項 1 に記載のクロス染色とマルチバイオマーカー方法。

【請求項 3】

該たんぱく質は、E - カドヘリン (E - c a d h e r i n)、癌タンパク質 p 6 3、平滑筋アクチン (S M A)、サイトケラチン H M C K、サイトケラチン C K 1 4、サイトケラチン C K 7、サイトケラチン C K 5 / 6 とサイトケラチン C K 8 / 1 8 からなることを特徴とする請求項 2 に記載のクロス染色とマルチバイオマーカー方法。

【請求項 4】

該ステップ (1) は、(1 1) 該組織検体を取得してから、該組織検体をワックスブロックに作成することと、(1 2) 該ワックスブロックに切片処理 (S e c t i o n i n g p r o c e s s) をすることで、複数枚の組織切片を得ること、及び、(1 3) 各組織切片に固定処理 (F i x a t i o n p r o c e s s) をすること、の詳細なステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載のクロス染色とマルチバイオマーカー方法。

【請求項 5】

前記クロス染色画像登録・融合は、(5 1) 一フレームの H & E 染色組織画像や一つのバイオマーカーを含む一フレームの I H C 染色組織画像を取得することと、及び、(5 2) 該 H & E 染色組織画像と前記バイオマーカーを含む該 I H C 染色組織画像に画像登録、且つ画像融合を行うこと、の処理ステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載のクロス染色とマルチバイオマーカー方法。

【請求項 6】

前記癌は乳癌であって、該ステップ (7) には、該組織検体に基底様乳癌 (B a s a l

10

20

30

40

50

- like Breast carcinoma、BC)があるかどうかを判断する下記の詳細なステップを含み、(71)該クロス染色組織画像にあるE-カドヘリンは陽性反応するかどうかを判断し、そうであれば、ステップ(72)を実行し、そうでなければ、ステップを終了することと、(72)該クロス染色組織画像に、該乳管組織の筋上皮細胞(Myoepithelial cells)の癌たんぱく質p63、サイトケラチンCK14とサイトケラチンCK5/6が全部陰性反応するかどうかを判断し、そうであれば、ステップ(73)を実行する、そうでなければ、終了することと、(73)該組織検体に基底様乳癌(Basal-like Breast carcinoma、BC)があることを判定することと、を含むことを特徴とする請求項1に記載のクロス染色とマルチバイオマーカー方法。

10

【請求項7】

前記癌は乳癌であって、該ステップ(7)には、該組織検体に非浸潤性乳管癌(Duodenal carcinoma in situ、DCIS)があるかどうかを判断する下記の詳細なステップ、(71)該クロス染色組織画像にあるE-カドヘリンが陽性反応するかどうかを判断し、そうであれば、ステップ(72A)を実行する、そうでなければ、ステップを終了することと、(72A)該クロス染色組織画像に、該乳管組織の上皮細胞(epithelial cells)の癌たんぱく質p63、サイトケラチンCK14とサイトケラチンCK5/6が全部陰性反応すると同時に、該乳管組織の筋上皮細胞(Myoepithelial cells)の癌たんぱく質p63、サイトケラチンCK14とサイトケラチンCK5/6が陽性反応するかどうかを判断し、そうであれば、ステップ(73A)を実行し、そうでなければ、終了することと、(73B)該組織検体に非浸潤性乳管癌(Duodenal carcinoma in situ、DCIS)があると判定することと、を含むことを特徴とする請求項1に記載のクロス染色とマルチバイオマーカー方法。

20

【請求項8】

前記癌は乳癌であって、該ステップ(7)には、該組織検体に異型乳管過形成(Atypical ductal hyperplasia、ADH)があるかどうかを判断する下記の詳細なステップを含み、(71)該クロス染色組織画像にあるE-カドヘリンが陽性反応するかどうかを判断し、そうであれば、ステップ(72B)を実行する、そうでなければ、ステップを終了することと、(72B)該クロス染色組織画像に、該乳管組織の筋上皮細胞(Myoepithelial cells)の癌たんぱく質p63、サイトケラチンCK14とサイトケラチンCK5/6が全部陽性反応すると同時に、該乳管組織の上皮細胞(epithelial cells)の癌たんぱく質p63、サイトケラチンCK14とサイトケラチンCK5/6が部分的陽性反応や部分的陰性反応するかどうかを判断し、そうであれば、ステップ(73B)を実行し、そうでなければ、終了することと、(73B)該組織検体に異型乳管過形成(Atypical ductal hyperplasia、ADH)があると判定することと、を含むことを特徴とする請求項1に記載のクロス染色とマルチバイオマーカー方法。

30

【請求項9】

前記癌は乳癌であって、該ステップ(7)には、該組織検体に上皮過形成(Epithelial Hyperplasia)があるかどうかを判断する下記の詳細なステップを含み、(71)該クロス染色組織画像にあるE-カドヘリンが陽性反応するかどうかを判断し、そうであれば、ステップ(72C)を実行する、そうでなければ、ステップを終了することと、(72C)該クロス染色組織画像に、該乳管組織の筋上皮細胞(Myoepithelial cells)の癌たんぱく質p63、サイトケラチンCK14とサイトケラチンCK5/6が全部陽性反応すると同時に、該乳管組織の上皮細胞(epithelial cells)の癌たんぱく質p63、サイトケラチンCK14とサイトケラチンCK5/6が陽性反応するかどうかを判断し、そうであれば、ステップ(73C)を実行し、そうでなければ、終了することと、(73C)該組織検体に、3層以上の上皮過形成があるかどうかを判断し、そうであれば、ステップ(74C)を実行する、そうで

40

50

なければ、ステップ(75C)を実行することと、(74C)該組織検体に上皮過形成(Epithelial Hyperplasia)があると判定することと、(75C)該組織検体が正常組織であると判定することと、を含むことを特徴とする請求項1に記載のクロス染色とマルチバイオマーカー方法。

【請求項10】

前記癌は、乳癌、卵巣癌、膵臓癌、肝臓癌、肺癌、結腸直腸癌、胃癌や食道癌の何れか一種であることを特徴とする請求項1に記載のクロス染色とマルチバイオマーカー方法。

【請求項11】

前記クロス染色とマルチバイオマーカー方法は市販の画像登録とクロス画像注釈システムに適用可能であることを特徴とする請求項1に記載のクロス染色とマルチバイオマーカー方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌の検出・診断技術分野、特に癌の診断支援に使用されるクロス染色とマルチバイオマーカー方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

乳癌とは、乳管細胞や小葉細胞の異常分裂による悪性腫瘍であって、感染した局所の乳房に加え、リンパ節によって他の臓器に転移する可能性も高い。一般的に、非浸潤性乳管癌(Duodenal carcinoma in situ, DCIS)、異型乳管過形成(Atypical ductal hyperplasia, ADH)、基底様乳癌(Basal-like Breast carcinoma, BC)に分類される前記乳癌の治療の面では、病理学を基礎に、少なくとも一組の組織切片の画像から、非浸潤性乳癌(DCIS)、基底様乳癌(BC)及び/又は異型乳管過形成(ADH)を有効に識別した後、医者はそれから適切な治療方法を作成することができる。

20

【0003】

図1は乳癌治療の流れ図である。臨床的に、医者にて乳癌患者のために提出された治療工程は普通、患者の乳房X線撮影や超音波検査画像によって、医者が臨床経験に基づいて、患者の乳房に腫瘍または嚢腫があるかどうかを判断するステップS1'と、検査結果によって乳房が正常な状況にある場合は、定期的にフォローアップするステップS2a'と、もし検査結果にて、乳房に腫瘍や嚢腫ができた并表示した場合は、医者が引き続いて患者に針生検(core needle biopsy)を行って組織切片を作成するステップS2'と、組織切片の染色画像に対する分析の結果によって、医者が前記乳癌がDCISであるかADHであるかを判断可能であるステップS3'と、前記乳癌がADHであれば、直接に手術して腫瘍を除去するステップS4'と、前記ステップS4'で除去された腫瘍が病理学的分析を通過した後、幸いにも、全部ADHであると判断した場合、手術後、患者に定期的にフォローアップするステップS7'と、を有する。

30

【0004】

また逆に、除去された腫瘍が、病理学的分析を通過した後、残念ながらその一部がDCISになったと判断した場合は、患者が、多発性腫瘍を確認するために、さらなる核磁気共鳴(MRI)を受けるステップS5'と、多発性腫瘍であれば、患者が、完全な乳房切除術を受けるステップS6'とを含み、幸いにも多発性腫瘍でなければ、患者は乳房の一部のみを切ればよく、最後に、前記ステップS7'の術後の連続治療では、完全な乳房切除術を受けた患者は、乳房再建手術を考えてもよく、部分乳房切除術を受けている患者は、引き続き放射線療法またはホルモン治療を受けなければならない。

40

【0005】

図1を見ると、「組織切片の病理学的分析の正確性」は、後続のステップS4'からステップS7'までの治療方案の選択に深刻な影響を与えることが分かる。これを考慮して、画像アライメント(alignment)や登録(registration)技術が

50

組織切片の染色画像に対する判断に広く応用されている。例えば、米国特許番号US 9, 818, 190に揭示した完全なスライド画像登録とクロス画像注釈システム(Whole slide image registration and cross-image annotation system)は、複数の組織切片の染色画像に対する特徴アライメントに応用可能であり、そのうち、一つがソース画像、一つが目的画像であるように定義された二つの画像は、同じ座標システムでその内容に対して、画像特徴分析を行ってもよい。

【0006】

例えば、米国特許番号US 9, 818, 190に揭示した内容によると、H & E染色を経た組織切片画像をソース画像に、IHC染色を経た組織切片画像を目的画像に定義することができ、次に、ユーザは、H & E染色された組織切片画像から一つの特徴区域を選択やマークすると、システムはIHC染色された組織切片画像にて、同じ特徴区域を自動に選択やマークする。簡単に言うと、前記完全なスライド画像登録とクロス画像注釈システムの助けを借り、医者は、組織切片の染色画像から患者の乳癌タイプを早くて確実に判断することが可能になる。

10

【0007】

残念ながら、前記完全なスライド画像登録とクロス画像注釈システムは、IHC染色された組織切片画像及び/又はH & E染色された組織切片画像の色によって、患者の乳癌タイプ、腫瘍のサイズや病巣の数を自発に判断できない。以上を考慮し、本案の発明者は、研究創作に努めた結果、本発明の癌の診断支援に使用されるクロス染色とマルチバイオマーカー方法の開発を遂に完成した。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、癌の診断支援に使用されるクロス染色とマルチバイオマーカー方法の提供を目的として、組織切片の画像を先にH & E染色組織画像とIHC染色組織画像の二組に分け、次に、別々のIHC染色組織画像とH & E染色組織画像に対して、クロス染色画像登録・融合処理を行うことによって、複数フレームのクロス染色組織画像を得、更に、特別に設計されたバイオマーカーの性能認識プロセスを通じて、得た前記複数フレームのクロス染色組織画像に腫瘍認識と定量分析を実行して、最後に、該組織検体が罹患した癌の細胞種類とその比率を自動的認識可能とする技術特徴を有しているクロス染色とマルチバイオマーカー方法を提供する。

30

本発明を組み合わせる場合、医者は、人工認識方法で検体が罹患した癌の細胞種類を識別しなくてもよいので、人工認識による如何なる判断ミスも避けることができる。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の前記目的に達成するために、本案の発明者に提供された癌の診断支援に使用されるクロス染色とマルチバイオマーカー方法に関する一つの実施形態では、(1)ある乳管組織を含む組織検体を取得してから、複数枚の組織切片を作成することと、(2)前記複数枚の組織切片を、少なくとも一つのヘマトキシリン-エオシン染色(H & E stain)群と少なくとも複数の免疫組織染色(Immunohistochemistry stain, IHC stain)群を含む複数枚の染色組織切片群に分割することと、そのうち、該複数のIHC染色群は少なくとも、E-カドヘリンのIHC染色群、癌タンパク質p63のIHC染色群、サイトケラチンCK14のIHC染色群、及びサイトケラチンCK5/6のIHC染色群を含む、(3)該ヘマトキシリン-エオシン染色群における組織切片に対して、ヘマトキシリン-エオシン染色処理を実行して複数枚のH & E染色組織切片を得、且つ該免疫組織染色群における組織切片に免疫組織染色処理を行うことで、複数枚のIHC染色組織切片を得ることと、(4)複数枚の該H & E染色組織切片と複数枚の該IHC染色組織切片を複数フレームのH & E染色組織画像と複数フレームのIHC染色組織画像に転換させることと、(5)これらのH & E染色組織画像とIHC染色

40

50

組織画像にクロス染色画像登録・融合を行うことと、(6)あらゆるIHC染色組織画像とH&E染色組織画像は全部、前記クロス染色画像登録・融合を完成して、複数フレームのクロス染色組織画像を得るまで、該ステップ(5)を繰り返すこと、及び、(7)得る該複数フレームのクロス染色組織画像に対して、腫瘍認識と定量分析を行うことで、該組織検体が罹患した癌細胞のタイプとその比率を自動的に識別することと、の各ステップを含む。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】乳癌治療の流れ図である。

【図2A】本発明のクロス染色とマルチバイオマーカー方法の流れ図である。

10

【図2B】本発明のクロス染色とマルチバイオマーカー方法の流れ図である。

【図3A】本発明のクロス染色とマルチバイオマーカー方法の概略流れ図である。

【図3B】本発明のクロス染色とマルチバイオマーカー方法の概略流れ図である。

【図4A】画像登録・融合の実行工程図である。

【図4B】画像登録・融合の実行工程図である。

【図4C】画像登録・融合の実行工程図である。

【図5A】ステップS7の流れに関する詳細な説明図である。

【図5B】ステップS7の流れに関する詳細な説明図である。

【図5C】ステップS7の流れに関する詳細な説明図である。

【図5D】ステップS7の流れに関する詳細な説明図である。

20

【図6】乳管の横断面を示す図である。

【図7】四枚のクロス染色組織画像を示す実際の画像図である。

【図8】四枚のクロス染色組織画像を示す実際の画像図である。

【図9】四枚のクロス染色組織画像を示す実際の画像図である。

【図10】四枚のクロス染色組織画像を示す実際の画像図である。

【図11】四枚のクロス染色組織画像を示す実際の画像図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下は、本発明に提出した癌の診断支援に使用されるクロス染色とマルチバイオマーカー方法をより明確に説明するために、図面を参照しながら、本発明に関する好ましい実施形態を詳細に説明する。

30

【0012】

本発明のクロス染色とマルチバイオマーカー方法の流れ図である図2Aと図2Bを参照する。本発明のクロス染色とマルチバイオマーカー方法は、主に癌タイプの識別と診断支援に使用される。

本発明のクロス染色とマルチバイオマーカー方法の概略流れ図である図3Aと図3Bを同時に参照する。図2Aによると、本発明の方法は、乳管組織を含む組織検体を取得してから、複数枚の組織切片に作成するように、ステップS1を先に実行する。図3Aから見ると、まず得た前記組織検体をワックスブロックに作成する必要がある、その後、該ワックスブロックに切片処理(Sectioning process)をすることで、複数枚の組織切片を得ることができるようになる、注意すべき点は、これらの組織切片に染色処理をする前、各組織切片に固定処理(Fixation process)をする必要がある点である。

40

【0013】

次に、ステップS2では、前記複数枚の組織切片を、少なくとも一つのヘマトキシリン-エオシン染色(H&E stain)群と、少なくとも複数の免疫組織染色(Immunohistochemistry stain, IHC stain)群とを含む複数の染色組織切片群に分割し、癌タイプの検出の面では、医者は対応する少なくとも一種類のたんぱく質地図を参照した上、対応する少なくとも一種類のたんぱく質を含有する組織切片を選択する。

50

ここで、前記たんぱく質は、E - カドヘリン (E - c a d h e r i n)、癌タンパク質 p 6 3、平滑筋アクチン (S m o o t h m u s c l e a c t i n , S M A)、高分子量サイトケラチン (H i g h m o l e c u l a r w e i g h t c y t o k e r a t i n , H M C K)、サイトケラチン C K 1 4、サイトケラチン C K 7、サイトケラチン C K 5 / 6 とサイトケラチン C K 8 / 1 8 からなる。簡単に言えば、乳癌診断に応用時、該複数の I H C 染色群は少なくとも、E - カドヘリンの I H C 染色群、癌タンパク質 p 6 3 の I H C 染色群、サイトケラチン C K 1 4 の I H C 染色群、及びサイトケラチン C K 5 / 6 の I H C 染色群を含む。

【 0 0 1 4 】

続いて、ステップ S 3 では、該ヘマトキシリン - エオシン染色群における組織切片に対して、ヘマトキシリン - エオシン染色処理を実行して複数枚の H & E 染色組織切片を得、且つ該複数の免疫組織染色群における組織切片に免疫組織染色処理を行うことで、複数枚の I H C 染色組織切片を得る。特に、そのうち第一組の免疫組織染色群の I H C 染色組織切片は E - カドヘリンの染色組織切片で、第二組の免疫組織染色群の I H C 染色組織切片は癌タンパク質 p 6 3 の染色組織切片で、第三組の免疫組織染色群の I H C 染色組織切片はサイトケラチン C K 1 4 の染色組織切片で、且つ第四組の免疫組織染色群の I H C 染色組織切片はサイトケラチン C K 5 / 6 の染色組織切片である。

更に、図 2 A と図 3 B に参照する。本発明の方法は、複数枚の該 H & E 染色組織切片と複数枚の該 I H C 染色組織切片を複数フレームの H & E 染色組織画像と複数フレームの I H C 染色組織画像に転換させるように、引き続いてステップ S 4 を実行する。

(6) あらゆる I H C 染色組織画像と H & E 染色組織画像は全部、前記クロス染色画像登録・融合を完成して、複数フレームのクロス染色組織画像を得るまで、該ステップ (5) を繰り返す。

(7) 得る該複数フレームのクロス染色組織画像に対して、腫瘍認識と定量分析を行うことで、該組織検体が罹患した癌細胞のタイプとその比率を自動的に識別する。

【 0 0 1 5 】

更に図 2 B と図 3 B を参照する。ステップ S 5 では、これらの H & E 染色組織画像と I H C 染色組織画像にクロス染色画像登録・融合を行う。

図 4 A、図 4 B と図 4 C は、画像登録・融合の実行工程図であり、図 3 B と図 4 A、図 4 B と図 4 C を参照する。一フレームの E - カドヘリンの染色組織画像、一フレームの癌タンパク質 p 6 3 の染色組織画像と一フレームのサイトケラチン C K 1 4 の染色組織画像は取り出され、そして一フレームの H & E 染色組織画像と画像登録・融合される。ここで、強調すべき点は、あるソース画像 (S o u r c e i m a g e) によって、ある目的画像 (T a r g e t i m a g e) にアライメントや登録するのに類似した技術、例えば L e a s t s q u a r e s、U n w a r p J、b U n w a r p J、E l a s t i c、C w R、C L A H E + b u n w a r p J、T r a k E M 2 などの方法が既に、組織切片の染色画像に対する判断に広く応用されている。しかし、本発明方法のステップ S 5 では、ソース画像と目的画像の画像アライメントに対して、非常に厳しい精度要件があるため、文献一、即ち W a n g e t . a l、" R o b u s t i m a g e r e g i s t r a t i o n o f b i o l o g i c a l m i c r o s c o p i c i m a g e s "、N a t u r e - S c i e n t i f i c R e p o r t s 4 : 6 0 5 0 (S C I、J C R 2 0 1 5 (7 / 6 3) i n M U L T I D I S C I P L I N A R Y S C I E N C E S、I F = 5 . 2 2 8) に提出した画像登録技術の使用が推奨される点である。

【 0 0 1 6 】

ソース画像と目的画像との画像アライメントや登録を完了した後、図 4 A、図 4 B と図 4 C に示すように、E - カドヘリンの染色組織画像と H & E 染色組織画像とは、画像融合技術で一フレームのクロス染色組織画像に組み合わせられる。癌タンパク質 p 6 3 の染色組織画像と H & E 染色組織画像とは、画像融合技術で一フレームのクロス染色組織画像に組み合わせられ、且つサイトケラチン C K 1 4 の染色組織画像と H & E 染色組織画像とは、画像融合技術で一フレームのクロス染色組織画像に組み合わせられる。図に表示されな

10

20

30

40

50

いが、サイトケラチンCK5/6の染色組織画像とH&E染色組織画像とも、画像融合技術によって一フレームのクロス染色組織画像に組み合わせられる。

該ステップS5を完了した後、本発明の方法は、あらゆるIHC染色組織画像とH&E染色組織画像を全部、一フレームのH&E染色組織画像と、前記クロス染色画像の登録・融合を完了して、複数フレームのクロス染色組織画像を得るまで、ステップS6を次第に実行し、更に該ステップ(5)を繰り返す。

【0017】

最後に、本発明の方法は、図2Bと図3Bに示すように、ステップS7を実行し、得た該複数フレームのクロス染色組織画像に対して、腫瘍認識と定量分析をし、それにより、該組織検体が罹患した癌細胞の種類を自動的に認識する。例えば、四種類のバイオマーカーの免疫化学反応を同時に識別することで、該組織検体が罹患した乳癌のタイプとその比率を自動的に認識することが可能になる。

図5Aと図5DはステップS7の詳細ステップの流れ図であり、そのうち、図5Aにて、該ステップS7に、該組織検体が基底様乳癌(Basal-like Breast carcinoma、BC)を罹患したかどうかを判断するための詳細ステップが含まれることを示した。

図5Aで描かれた詳細ステップの実行工程を説明する前に、乳管の組織構造を紹介する必要がある。図6は乳管の横断面を示す図であり、図6から見ると、乳管の上皮組織(ductal epithelium)は主に、管腔上皮細胞(Luminal epithelial cells、LEP cells)と筋上皮細胞(Myoe epithelial cells、MEP cells)からなることが分かる。

【0018】

先ず、該クロス染色組織画像におけるE-カドヘリンが陽性反応をするかどうかを判断するためのステップS71を実行し、そうであれば、該クロス染色組織画像において、該乳管組織の筋上皮細胞(Myoe epithelial cells)の癌タンパク質p63、サイトケラチンCK14及びサイトケラチンCK5/6が陰性反応をすると判断するステップS72を行い、ステップS72による判断結果が「是」である場合、ステップS73にて該組織検体に乳癌(Basal-like Breast carcinoma、BC)が含まれると判定する。

図7は四枚のクロス染色組織画像と一枚のIHC染色画像を示す実際の画像図である。そのうち、図7における画像(a)はE-カドヘリンの染色組織画像で、画像(b)は癌タンパク質p63の染色組織画像で、画像(c)はサイトケラチンCK14の染色組織画像で、画像(d)はサイトケラチンCK5/6の染色組織画像で、且つ画像(e)はH&E染色組織画像である。この四枚のIHC染色画像を該H&E染色組織画像と対応する四枚のクロス染色組織画像に作成した後、この四枚のクロス染色組織画像に対する観察を通じて、該組織検体に基底様乳癌(BC)が含まれることが判断できる。

【0019】

図5Bは該ステップS7に、該組織検体が非浸潤性乳管癌(Duodenal carcinoma in situ、DCIS)を罹患したかどうかを判断するための詳細ステップが含まれることを示す。まず、該クロス染色組織画像におけるE-カドヘリンが陽性反応をするかどうかを判断するためのステップS71Aを実行し、そうであれば、該クロス染色組織画像において、該乳管組織の上皮細胞(epithelial cells)の癌タンパク質p63、サイトケラチンCK14及び/又はサイトケラチンCK5/6が前記陰性反応をするとともに、該乳管組織の筋上皮細胞(Myoe epithelial cells)の癌タンパク質p63、サイトケラチンCK14及びサイトケラチンCK5/6が陽性反応をするかどうかと判断するステップS72Aを行う。ステップS72Aによる判断結果が「是」である場合、ステップS73Aにて該組織検体に非浸潤性乳管癌(Duodenal carcinoma in situ、DCIS)が含まれると判定する。

図8は四枚のクロス染色組織画像と一枚のIHC染色画像を示す実際の画像図である。

そのうち、図 8 における画像 (a) は E - カドヘリンの染色組織画像で、画像 (b) は癌タンパク質 p 6 3 の染色組織画像で、画像 (c) はサイトケラチン C K 1 4 の染色組織画像で、画像 (d) はサイトケラチン C K 5 / 6 の染色組織画像で、且つ画像 (e) は H & E 染色組織画像である。この四枚の I H C 染色画像を該 H & E 染色組織画像と対応する四枚のクロス染色組織画像に作成した後、この四枚のクロス染色組織画像に対する観察を通じて、該組織検体に非浸潤性乳管癌 (D C I S) が含まれることが判断できる。

【 0 0 2 0 】

また、図 5 C は該ステップ S 7 に、該組織検体が異型乳管過形成 (A t y p i c a l d u c t a l h y p e r p l a s i a , A D H) を罹患したかどうかを判断するための詳細ステップが含まれることを示す。まず、該クロス染色組織画像における E - カドヘリンが陽性反応をするかどうかを判断するためのステップ S 7 1 B を実行し、そうであれば、該クロス染色組織画像において、該乳管組織の筋上皮細胞 (M y o e p i t h e l i a l c e l l s) の癌タンパク質 p 6 3、サイトケラチン C K 1 4 及びサイトケラチン C K 5 / 6 が全部陽性反応をすると同時に、該乳管組織の上皮細胞 (e p i t h e l i a l c e l l s) のサイトケラチン C K 1 4 及び / 又はサイトケラチン C K 5 / 6 が部分的に陽性反応や部分的に陰性反応をするかどうかを判断するステップ S 7 2 B を行う。ステップ S 7 2 B による判断結果が「是」である場合、ステップ S 7 3 B にて該組織検体に異型乳管過形成 (A t y p i c a l d u c t a l h y p e r p l a s i a , A D H) が含有されると判定する。

図 9 は四枚のクロス染色組織画像と一枚の I H C 染色画像を示す実際の画像図である。そのうち、図 9 における画像 (a) は E - カドヘリンの染色組織画像で、画像 (b) は癌タンパク質 p 6 3 の染色組織画像で、画像 (c) はサイトケラチン C K 1 4 の染色組織画像で、画像 (d) はサイトケラチン C K 5 / 6 の染色組織画像で、且つ画像 (e) は H & E 染色組織画像である。この五枚の I H C 染色画像を該 H & E 染色組織画像と対応する五枚のクロス染色組織画像に作成した後、この五枚のクロス染色組織画像に対する観察を通じて、該組織検体に異型乳管過形成 (A D H) が含まれることが判断できる。

【 0 0 2 1 】

更に、図 5 D は該ステップ S 7 に、該組織検体が上皮過形成 (E p i t h e l i a l H y p e r p l a s i a) を罹患したかどうかを判断するための詳細ステップが含まれることを示す。まず、該クロス染色組織画像における E - カドヘリンが陽性反応をするかどうかを判断するためのステップ S 7 1 C を実行し、そうであれば、該クロス染色組織画像において、該乳管組織の筋上皮細胞 (M y o e p i t h e l i a l c e l l s) の癌タンパク質 p 6 3、サイトケラチン C K 1 4 及びサイトケラチン C K 5 / 6 が全部陽性反応をすると同時に、該乳管組織の上皮細胞 (e p i t h e l i a l c e l l s) のサイトケラチン C K 1 4 及び / 又はサイトケラチン C K 5 / 6 が陽性反応をするかどうかを判断するステップ S 7 2 C を行う。ステップ S 7 2 C による判断結果が「是」である場合、ステップ S 7 3 C にて該組織検体に 3 層以上の上皮過形成が発生するかどうかを続けて判定する。ステップ S 7 9 C による判断結果が「是」であれば、ステップ S 7 4 C にて、該組織検体に上皮過形成 (E p i t h e l i a l H y p e r p l a s i a) を有するかどうかを判定する。逆に、ステップ S 7 5 C にて、該組織検体が正常組織であるように判定する。

【 0 0 2 2 】

図 1 0 は四枚のクロス染色組織画像と一枚の I H C 染色画像を示す実際の画像図である。図 1 0 における画像 (a) は E - カドヘリンの染色組織画像で、画像 (b) は癌タンパク質 p 6 3 の染色組織画像で、画像 (c) はサイトケラチン C K 1 4 の染色組織画像で、画像 (d) はサイトケラチン C K 5 / 6 の染色組織画像で、且つ画像 (e) は H & E 染色組織画像である。この五枚の I H C 染色画像を該 H & E 染色組織画像と対応する五枚のクロス染色組織画像に作成した後、この五枚のクロス染色組織画像に対する観察を通じて、該組織検体に上皮過形成が含まれることが判断できる。

図 1 1 は四枚のクロス染色組織画像を示す実際の画像図である。図 1 1 における画像 (

a) は E - カドヘリンの染色組織画像で、画像 (b) は癌タンパク質 p 6 3 の染色組織画像で、画像 (c) はサイトケラチン C K 1 4 の染色組織画像で、画像 (d) はサイトケラチン C K 5 / 6 の染色組織画像で、且つ画像 (e) は H & E 染色組織画像である。この五枚の I H C 染色画像を該 H & E 染色組織画像と対応する五枚のクロス染色組織画像に作成した後、この五枚のクロス染色組織画像に対する観察を通じて、該組織検体が正常の乳管上皮組織であると判断できる。

【 0 0 2 3 】

図 5 A ~ 図 5 D の流れ図に基づき、我々は乳癌タイプの分類方法を下記表 (1) に整理して表示する。

【 0 0 2 4 】

10

【 表 1 】

乳癌タイプ	分類方法
正常 (乳癌に罹患せず)	E - カドヘリンは陽性 (+) とする 癌たんぱく質 p 6 3 は陽性 (+) とする サイトケラチン C K 1 4 は陽性 (+) とする サイトケラチン C K 5 / 6 は陽性 (+) とする
異型乳管過形成 (1) (ADH)	E - カドヘリンは陽性 (+) とする 癌たんぱく質 p 6 3 は陽性 (+) とする サイトケラチン C K 1 4 は陽性 (+) とする サイトケラチン C K 5 / 6 は陰性 (-) とする
異型乳管過形成 (2) (ADH)	E - カドヘリンは陽性 (+) とする 癌たんぱく質 p 6 3 は陽性 (+) とする サイトケラチン C K 1 4 は陰性 (-) とする サイトケラチン C K 5 / 6 は陽性 (+) とする
非浸潤性乳管癌 (D I C S)	E - カドヘリンは陽性 (+) とする 癌たんぱく質 p 6 3 は陽性 (+) とする サイトケラチン C K 1 4 は陰性 (-) とする サイトケラチン C K 5 / 6 は陰性 (-) とする
第一型の腫瘍を有する (1)	E - カドヘリンは陽性 (+) とする 癌たんぱく質 p 6 3 は陰性 (-) とする サイトケラチン C K 1 4 は陽性 (+) とする サイトケラチン C K 5 / 6 は陰性 (-) とする
第一型の腫瘍を有する (2)	E - カドヘリンは陽性 (+) とする 癌たんぱく質 p 6 3 は陰性 (-) とする サイトケラチン C K 1 4 は陰性 (-) とする サイトケラチン C K 5 / 6 は陽性 (+) とする
第二型の腫瘍を有する	E - カドヘリンは陽性 (+) とする 癌たんぱく質 p 6 3 は陰性 (-) とする サイトケラチン C K 1 4 は陽性 (+) とする サイトケラチン C K 5 / 6 は陽性 (+) とする
基底様乳癌 (B C)	E - カドヘリンは陽性 (+) とする 癌たんぱく質 p 6 3 は陰性 (-) とする サイトケラチン C K 1 4 は陰性 (-) とする サイトケラチン C K 5 / 6 は陰性 (-) とする

20

30

40

【 0 0 2 5 】

追加説明として、図 5 B の流れ図によって、非浸潤性乳管癌 (D C I S) を判断する方法を下記表 (2)、表 (3) と表 (4) に整理して表示する。

【 0 0 2 6 】

50

【表 2】

乳癌 タイプ	乳管 組織	IHC染色後の反応表現 陽性：＋ 陰性：－			
		E－C a d h e r i n	P 6 3	CK 1 4	CK 5／6
DCIS	上皮細胞	＋	－	－	－
	筋上皮細胞	＋	＋	－	－

10

【0027】

【表 3】

乳癌 タイプ	乳管 細胞	IHC染色後の反応表現 陽性：＋ 陰性：－			
		E－C a d h e r i n	P 6 3	CK 1 4	CK 5／6
DCIS	上皮細胞	＋	－	－	－
	筋上皮細胞	＋	－	＋	－

20

【0028】

【表 4】

乳癌 タイプ	乳管 組織	IHC染色後の反応表現 陽性：＋ 陰性：－			
		E－C a d h e r i n	P 6 3	CK 1 4	CK 5／6
DCIS	上皮細胞	＋	－	－	－
	筋上皮細胞	＋	－	－	＋

30

【0029】

表（１）を参照する。IHC染色の反応表現がはっきりと部分的陽性反応及び／又は部分的陰性反応と区別できない場合においては、該組織検体が上皮過形成（E p i t h e l i a l H y p e r p l a s i a）や異型乳管過形成（A D H）を罹患したかどうかを判断することが確かに難しい。そういう場合、本発明の方法は該組織検体に異型乳管過形成があるかどうかの判定に優先する。

【0030】

特定の状況では、例えば、筋上皮細胞（M y o e p i t h e l i a l c e l l s）のケラチン細胞やタンパク質のIHC染色反応が陰性に表したが、上皮細胞（e p i t h e l i a l c e l l s）のケラチン細胞やタンパク質のIHC染色反応が部分的陽性に表すのに類似した特定の状況において、本発明の方法は該組織検体に基底様乳癌（B C）があるかどうかを判定する。

40

一方、組織検体は普通、中核針生検（c o r e n e e d l e b i o p s y）によって取得されるので、検体を取得する工程中、誤操作で組織切片の画像に境界が明確に表示されることができなくなってしまう可能性がある。従って、そういう場合には、システムが該乳管組織の上皮細胞（e p i t h e l i a l c e l l s）の癌たんぱく質p 6 3、サイトケラチンCK 1 4とサイトケラチンCK 5／6が全部陰性反応をすることを認識したが、筋上皮細胞（M y o e p i t h e l i a l c e l l s）の癌たんぱく質p 6 3、

50

サイトケラチンＣＫ１４とサイトケラチンＣＫ５／６が全部陰性反応をするかどうかを順調に識別できない場合、システムは該組織検体に非浸潤性乳管癌（ＤＩＣＳ）があるかどうかの判定に優先する。

【００３１】

強調すべき点は、本発明は図５Ａから図５Ｄにて、Ｅ－カドヘリン（Ｅ－ｃａｄｈｅｒｉｎ）、癌たんぱく質ｐ６３、サイトケラチンＣＫ１４とサイトケラチンＣＫ５／６という四種類のバイオマーカーに対する認識を通じて、該組織検体が罹患した癌細胞のタイプを認識する工程を手本として示したが、これはステップＳ７の詳細実行ステップの構成を限定する意図ではない点である。例えば、サイトケラチンＣＫ１４、ＣＫ８、ＣＫ１８は全部乳腺細胞の過形成を表してもよく、それで、ＣＫ８やＣＫ１８でＣＫ１４を置換することが可能である。もう一方では、平滑筋アクチン（ＳＭＡ）とサイトケラチンＣＫ５／６とも筋上皮前駆細胞の過形成を表すことができるので、ＳＭＡでＣＫ５／６を置換してもよい。

10

【００３２】

同時に、上記の説明によると、更に本発明のクロス染色とマルチバイオマーカー方法を、乳癌を除いた、例え卵巣癌、膵臓癌、肝臓癌、肺癌、結腸直腸癌、胃癌や食道癌などの癌の認識に応用してもよいことが分かる。本発明を採用する場合、医者は上記の何れかの癌を有する組織検体に、以下の項目を実現しやすくなる。

- （１）腫瘍の診断と鑑別
- （２）癌の腫瘍細胞に対する病理学的タイピング
- （３）腫瘍の正確な組織学分類の特定
- （４）病巣の数の確認
- （５）医者 of 癌治療方案のために有力な支援の提供

20

【００３３】

上記は、本発明の癌の診断支援に使用されるクロス染色とマルチバイオマーカー方法をはっきり説明したわけではない。本発明は以下（１）（２）の利点を有する。

【００３４】

（１）本発明は、組織切片の画像を先にＨ＆Ｅ染色組織画像とＩＨＣ染色組織画像の二組に分け、次に、別々のＩＨＣ染色組織画像とＨ＆Ｅ染色組織画像に対して、クロス染色画像登録・融合処理を行うことによって、複数フレームのクロス染色組織画像を得、更に、特別に設計されたバイオマーカーの性能認識プロセスを通じて、得た前記複数フレームのクロス染色組織画像に腫瘍認識と定量分析を実行して、最後に、該組織検体が罹患した癌の細胞種類とその比率を自動的認識可能になった、という技術特徴を有しているクロス染色とマルチバイオマーカー方法を提供し、本発明を組み合わせる場合、医者は、人工認識方法で検体が罹患した癌の細胞種類を識別しなくてもよいので、人工認識による如何なる判断ミス avoid することができるようになる。

30

【００３５】

（２）本発明のクロス染色とマルチバイオマーカー方法は、市販の何れかの画像アライメントとクロス画像注釈システム、例えば、ライカのＬｅｉｃａ ＢｉｏｓｕｓｔｅｍｓやＰｏｌａｒｉｓによるＶｅｃｔｒａ全自動定量病理イメージングシステムと合わせて癌の診断支援に使用してもよい。

40

【００３６】

強調すべき点は、以上、本発明の実現可能な実施形態を詳細に説明したが、これらの実施形態は、本発明の範囲を限定することを意図していないという点である。発明の要旨を逸脱しない均等実施形態や変更も、本案の特許請求の範囲に含まれるものである。

【符号の説明】

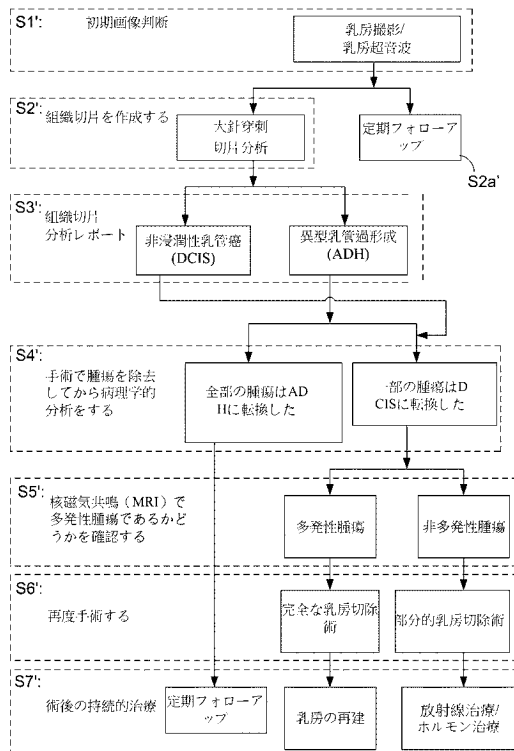
【００３７】

- Ｓ１－Ｓ４ ステップ
- Ｓ５－Ｓ７ ステップ
- Ｓ７１－Ｓ７３ ステップ

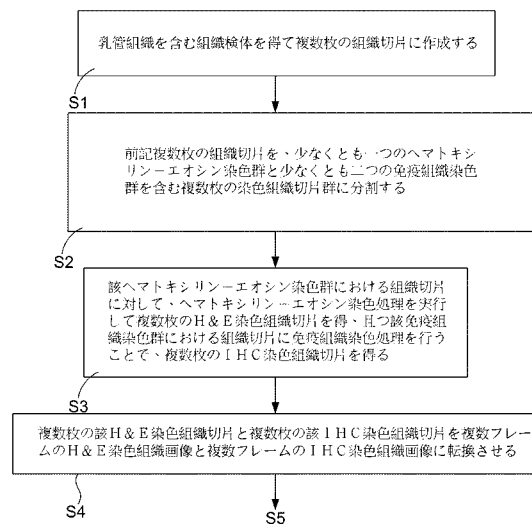
50

S 7 1 A - S 7 3 A ステップ
 S 7 1 B - S 7 3 B ステップ
 S 7 1 C - S 7 5 C ステップ
 S 1 ' ステップ
 S 2 a ' ステップ
 S 2 ' - S 7 ' ステップ

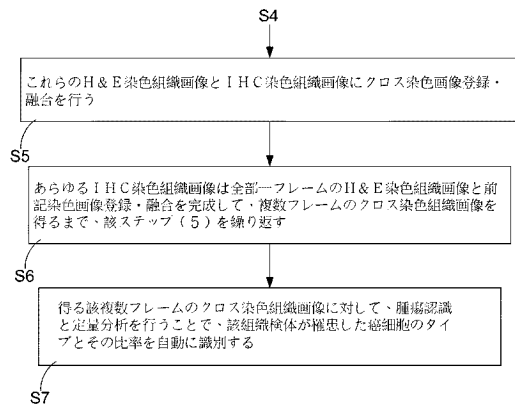
【図 1】



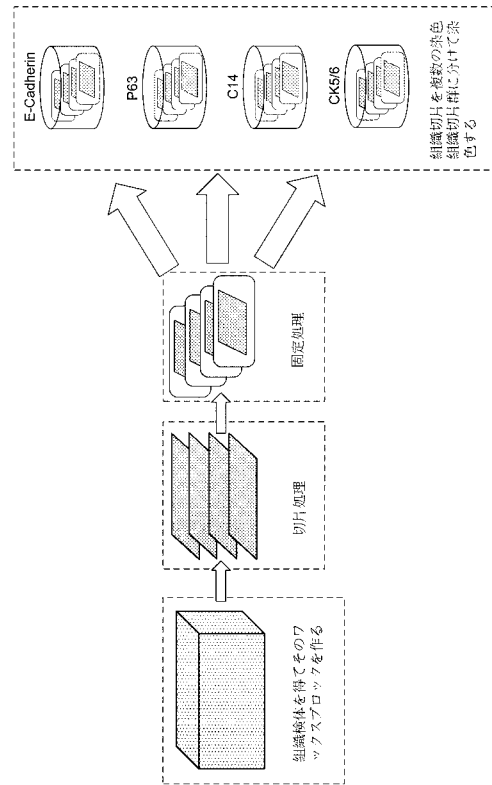
【図 2 A】



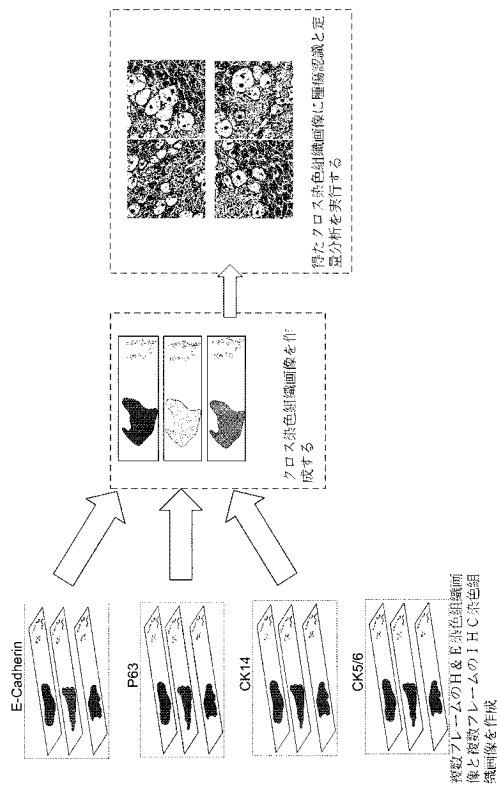
【図 2 B】



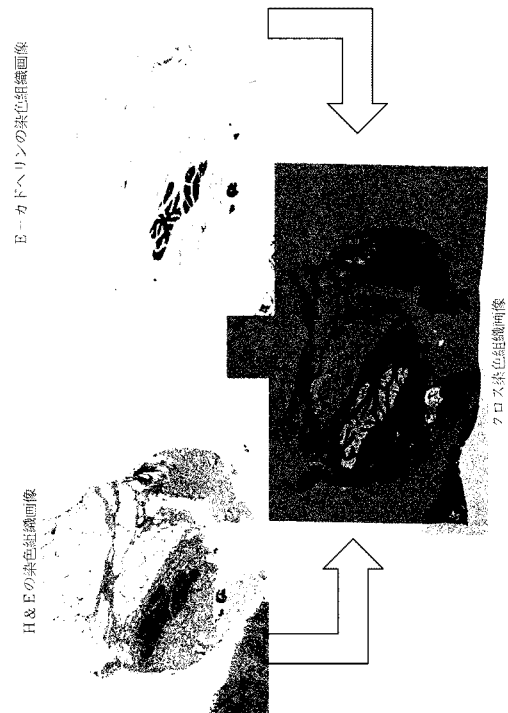
【図 3 A】



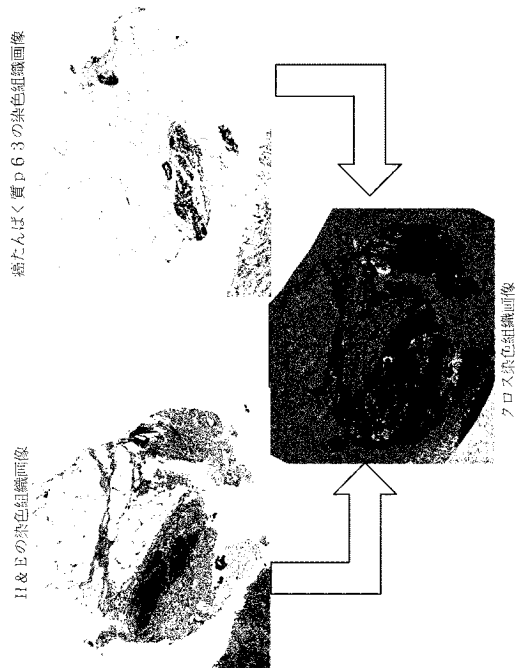
【図 3 B】



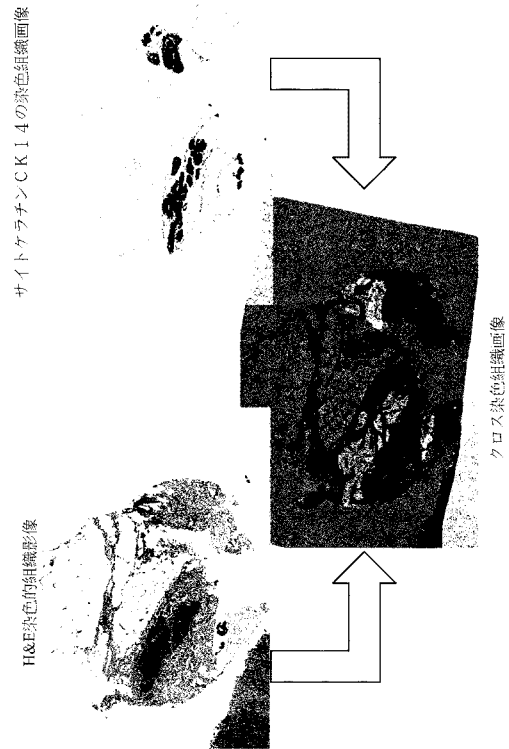
【図 4 A】



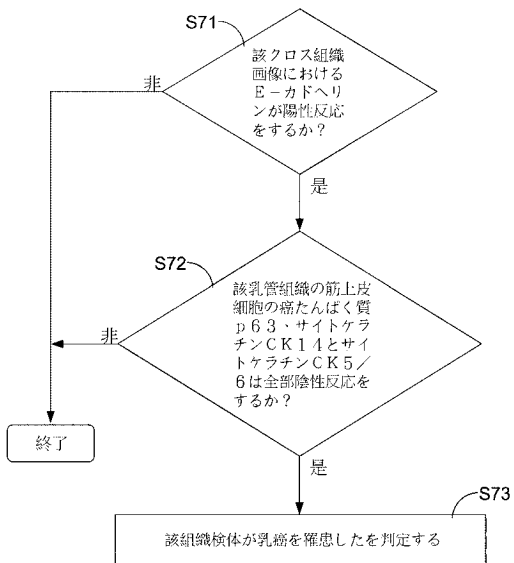
【図 4 B】



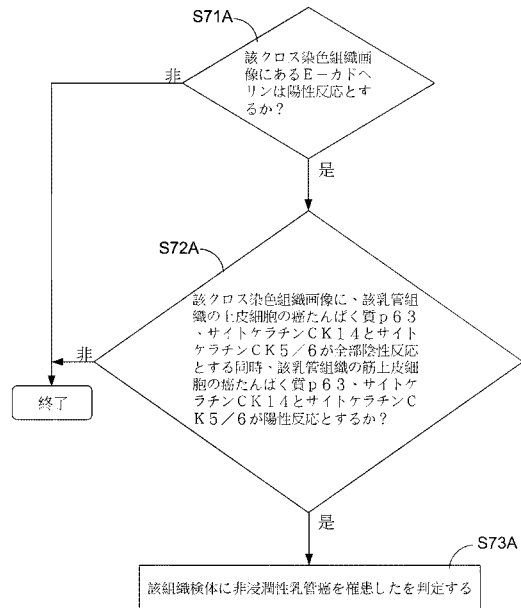
【図 4 C】



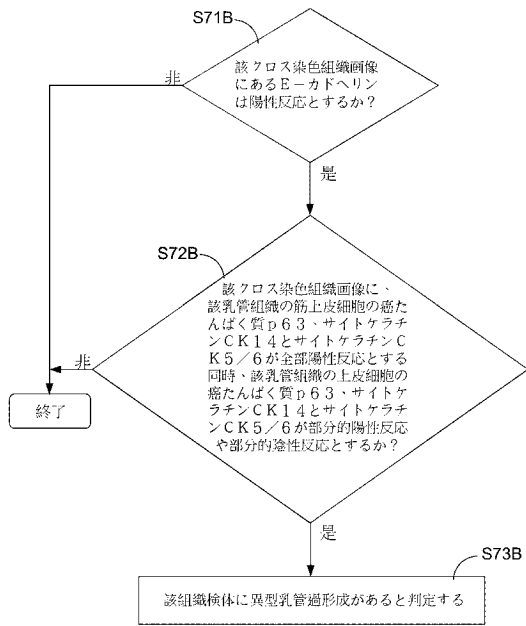
【図 5 A】



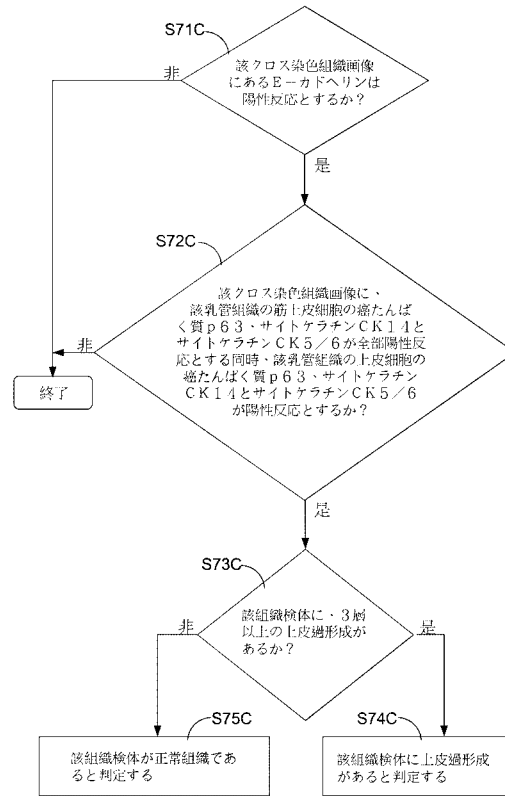
【図 5 B】



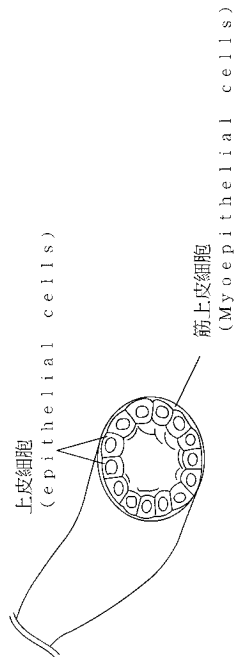
【図 5 C】



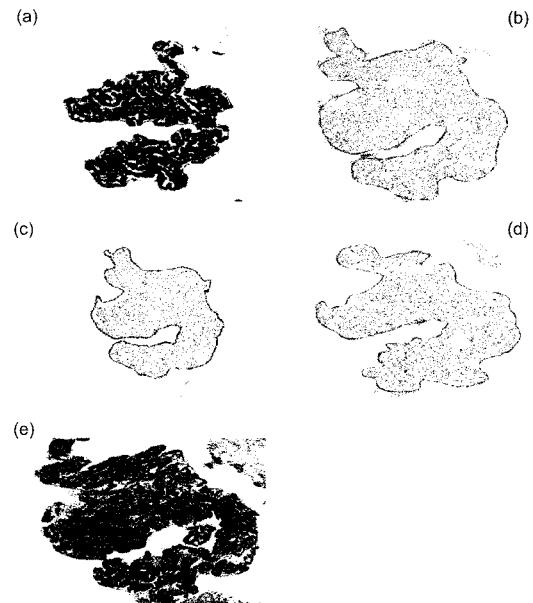
【図 5 D】



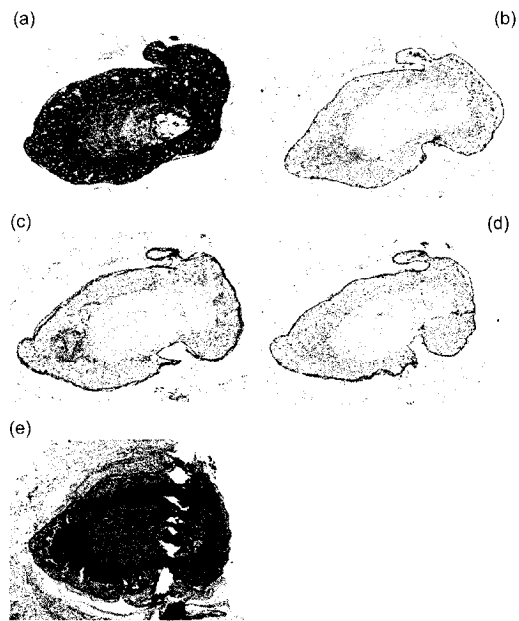
【図 6】



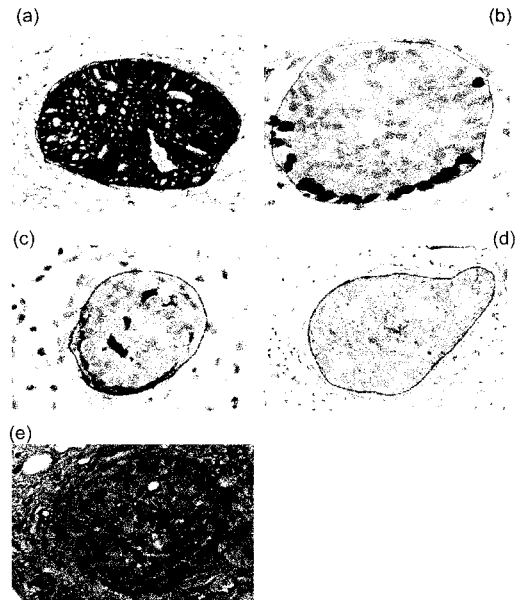
【図 7】



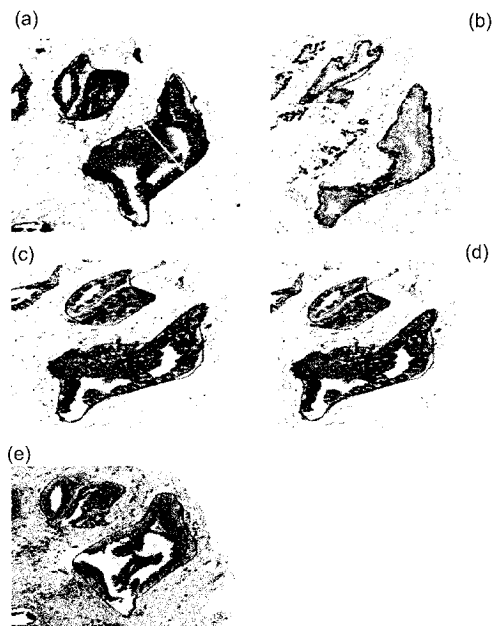
【 図 8 】



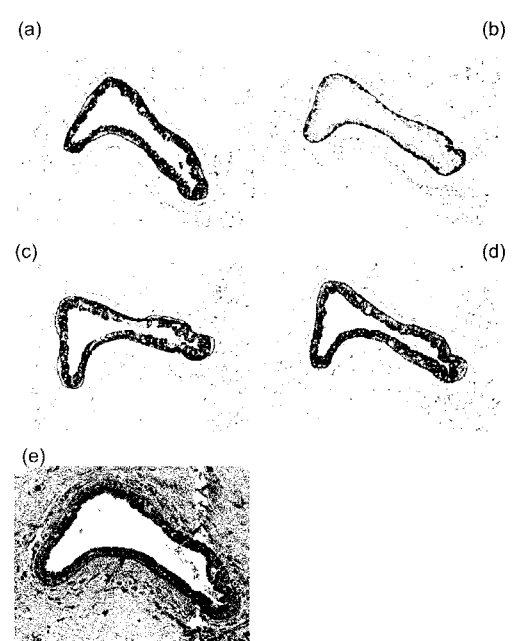
【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



专利名称(译)	交叉染色和多生物标志物方法用于癌症诊断支持		
公开(公告)号	JP2019211461A	公开(公告)日	2019-12-12
申请号	JP2018208076	申请日	2018-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	国立台湾科技大学		
申请(专利权)人(译)	国立台湾科技大学		
[标]发明人	王靖維		
发明人	王靖維 陳燕麟		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/48 G01N33/483 G01N33/53		
CPC分类号	G01N1/28 G01N1/30 G01N33/57415 G01N2570/00 G06T7/0012 G06T2207/30068 G01N33/582		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/48.P G01N33/483.C G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA19		
代理人(译)	大岛信行		
优先权	107118500 2018-05-30 TW		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供一种可用于癌症类型识别和诊断支持的交叉染色和多种生物标志物方法。两组H&E染色的组织图像和IHC染色的组织图像；然后，通过分别对IHC染色组织图像和H&E染色组织图像进行交叉染色图像配准和融合处理，获得多个帧的交叉染色组织图像。另外，通过特别设计的生物标志物性能识别过程，对获得的多个帧的交叉染色组织图像进行肿瘤识别和定量分析。最后，自动识别影响组织标本的癌症细胞类型及其百分比。选定的图纸：图2A

